

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pendekatan dan Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *True Eksperimen Design* (eksperimen yang sebenarnya) karena dalam desain ini peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen, dengan demikian validitas internal yaitu kualitas pelaksanaan rancangan penelitian dapat menjadi tinggi. Peneliti menggunakan desain eksperimen jenis *Posstest-Only Control Design*. Desain ini terdiri dari dua kelompok yang masing-masing dipilih secara random (R). Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok lain tidak. Kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang yang beralamat di Jl. Raya Tlogomas No. 246 Malang pada bulan Mei- Juli 2018.

3.3 Populasi, Teknik Sampling, dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah lotion bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*).

3.3.2 Teknik Sampling

Pengambilan sampel dengan menggunakan cara *simple random sampling* dapat digunakan dengan menggunakan rumus:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

$$6(r-1) \geq 15$$

$$6r-6 \geq 15$$

$$\frac{r \geq 21}{6}$$

$$r \geq 3.5 \text{ (dibulatkan menjadi 4 kali ulangan)}$$

$$n = t.r$$

$$= 7.4$$

$$= 28$$

keterangan :

r : Replikasi

t : *Treatment* (perlakuan)

n : Jumlah sampel (perlakuan)

3.3.3 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah lotion bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) dan sampel bakteri *Propionibacterium acnes* diisolasi pada media agar darah dan dinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam dan kemudian masing-masing perlakuan memiliki 4x ulangan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1. Jenis variabel

a) Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah lotion bawang dayak dengan konsentrasi ekstrak sebesar 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, adapun perlakuan kontrol menggunakan tetrasiklin 2%.

b) Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* pada medium agar darah.

c) Variabel Kontrol

Variabel kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah lama inkubasi, suhu inkubasi, dan medium biakan.

3.4.2 Defisi Operasional Variabel

Setiap variabel perlu didefinisikan untuk mengurangi kesalahan dalam memaknai suatu kalimat yang digunakan dalam penelitian. Adapun definisi operasional variabel tersebut, yakni:

- a) Variabel bebas dalam penelitian ini berupa kertas cakram direndam selama 5 menit yang berisi lotion bawang dayak dengan konsentrasi ekstrak sebesar 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%.
- b) Simplisia bawang dayak (*E. palmifolia*) sebanyak 600 gram, kemudian simplisia bawang dayak yang dilarutkan dengan 1000 ml larutan etanol 95% yang akan mendapatkan konsentrasi ekstrak sebesar 100%. Selanjutnya dari ekstrak tersebut dibuat lotion dengan konsentrasi ekstrak sebesar 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%.
- c) Diameter zona hambat *Propionibacterium acnes* adalah daerah bening sekitar cakram disk tidak ditemukannya pertumbuhan *Propionibacterium acnes* yang dihitung menggunakan jangka sorong.
- d) Uji aktivitas lotion bawang dayak terhadap zona hambat bakteri pertumbuhan *Propionibacterium acnes* merupakan tahapan penelitian yang secara urut dilaksanakan. Aktivitas yang dilakukan seperti mengambil sebanyak 1 mL suspensi *Propionibacterium acnes* yang setara dengan Mac Farland 0,5 diinokulasikan ke dalam media *MHA* steril, kemudian dibiarkan

memadat. Sebanyak dua puluh delapan patri disk disiapkan, kemudian mengisi empat patridisk diisi lotion bawang dayak dengan konsentrasi 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% dan patridisk tersisa disi kontrol dan kontrol positif (tetrasiklin 2%). Inkubasi selama 24 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C dan diamati zona hambatnya (Tiran & Nastiti, 2014).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

Persiapan alat dan bahan untuk penelitian dibagi menjadi 4 tahap. Tahapan prosedur tersebut seperti persiapan alat dan bahan pembuatan *lotion* bawang dayak, persiapan alat dan bahan pembuatan medium dan suspensi bakteri, persiapan penelitian untuk mengetahui pengaruh *lotion* bawang dayak terhadap zona hambat bakteri, dan strelisasi bahan dapat dilihat dalam dalam Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Tabel Alat dan Bahan Pembuatan *Lotion* Ekstrak Bawang Dayak

Alat					
No	Nama Alat	Jumlah	No	Nama Alat	Jumlah
1.	Gelas ukur	1	7.	Rak tabung reaksi	1
2.	Gelas erlenmeyer	1	8.	Hotplate	1
3.	Tabung reaksi	4	9.	Timbangan analitik	1
4.	Wadah plastik	7	10.	Mikropipet	2
5.	Beakerglass besar	1	11.	Spatula	1
6.	Beakerglass kecil	2			
Bahan					
No	Nama Alat	Jumlah	No	Nama Bahan	Jumlah
1.	Aquades	150 ml	3.	TEA	10 ml
2.	Ekstrak bawang dayak	50 mg	4.	Carbomer	0,24 mg

Pembuatan medium dan suspensi bakteri juga memiliki persiapan alat dan bahan sendiri agar tidak terkontaminasi. Alat yang digunakan harus dalam keadaan steril agar tidak terkontaminasi dengan hal yang mempengaruhi penelitian. Persiapan yang tepat harus diperhatikan dengan seksama. Hal tersebut diperhatikan dalam persiapan alat dan bahan seperti Tabel 3.6.

Tabel 3.6 Persiapan Alat dan Bahan Pembuatan Medium Dan Suspensi Bakteri

Alat					
No	Nama Alat	Jumlah	No	Nama Alat	Jumlah
1.	Gelas erlenmeyer	1	8.	Inkubator	1
2.	Tabung reaksi	4	9.	Kasa	1
3.	Vortex	1	10.	Tisu	1
4.	Jarum ose	11	11.	Label	1
5.	Pipet	1	12.	Rak tabung	1
6.	Pinset	1	13.	Cawan petri	14
7.	Laminator air flow	1			

Bahan					
No	Nama Alat	Jumlah	No	Nama Bahan	Jumlah
1.	Aquades steril	100 ml	3.	<i>Propionibacterium acnes</i>	
2.	Larutan Standar 0,5 Mf	20 ml	4.	MHA	38,16 gram

Persiapan penelitian untuk mengetahui pengaruh aktivitas *lotion* bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) terhadap zona hambat bakteri harus dipersiapkan dan tidak tercampur dengan alat penelitian lain. Alat harus diperhatikan kesterilannya agar tidak terkontaminasi. Persiapan alat dan Bahan pembuatan *lotion* terdapat pada Tabel 3.7 sebagai berikut.

Tabel 3.7 Alat dan Bahan Penelitian Pengaruh Lotion Bawang Dayak Terhadap Zona Hambat Bakteri

Alat					
No	Nama Alat	Jumlah	No	Nama Alat	Jumlah
1.	Cawan petri	14 buah	6.	Mikropipet	1
2.	Papper disk	28 buah	7.	Bunsen	1
3.	Autoklaf	1	8.	Korek	1
4.	Inkubator	1	9.	Tabung reaksi	4
5.	Penjepit	1	10.	Rak tabung	1

Bahan			Jumlah		
No	Nama Bahan				
1.	Lotion ekstrak bawang dayak		7 wadah		
2.	cawan yang telah ditanami bakteri		14 buah		

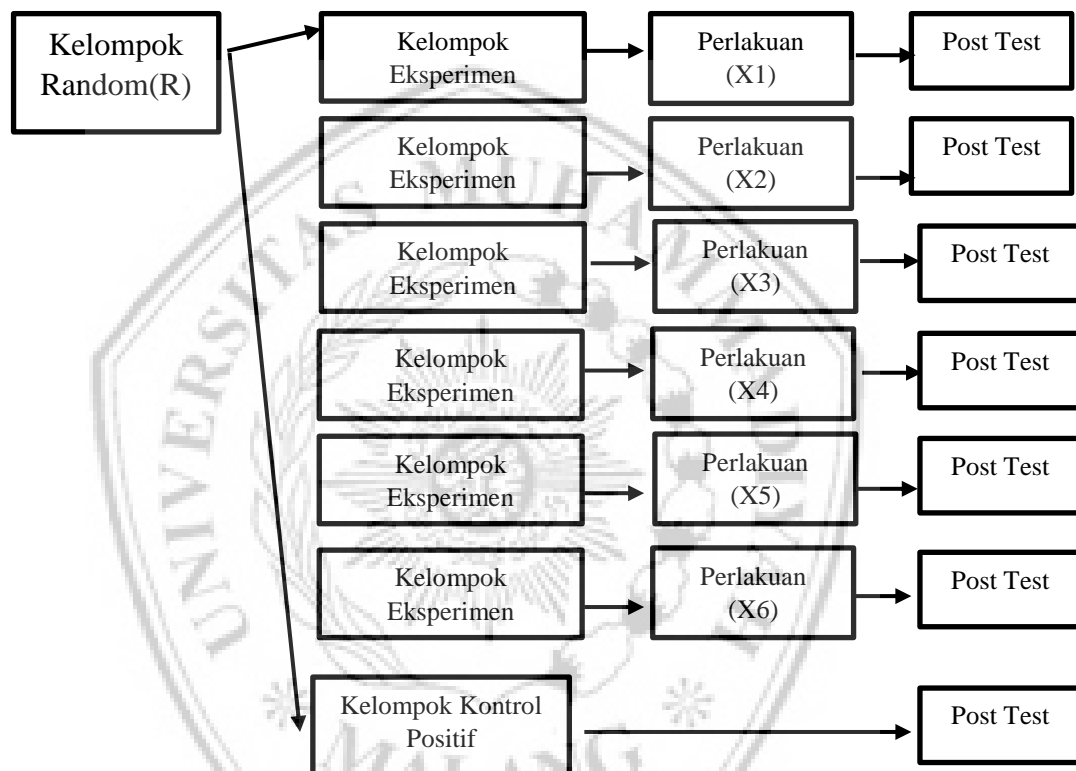
Tabel 3.8 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat					
No	Nama Alat	Jumlah	No	Nama Alat	Jumlah
1.	Gelas erlenmeyer	1	8.	Tabung reaksi	4
2.	Tabung reaksi	4	9.	Wadah plastik	7
3.	Pinset	1	10.	Beakerglass besar	1
4.	Cawan petri	14	11.	Beakerglass kecil	2
5.	Gelas ukur	1	12.	Spatula	2

Bahan					
No	Nama bahan	Jumlah	No	Nama bahan	Jumlah
1.	Aquades	200 ml	2.	MHA	10 gram

3.5.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang dilakukan sesuai sifat masalahnya pada penelitian dan banyak perlakuan. yang diteliti. Rancangan penelitian yang digunakan eksperimental sesungguhnya menggunakan desain *Posstest-Only Control*. Berikut merupakan Gambar 3.5 desain penelitian.



Gambar 3.5 Desain Penelitian

Keterangan:

- a) R merupakan kelompok Random Sampling yang terdiri dari dari kelompok perlakuan dan kelompok tidak ada perlakuan atau disebut dengan kelompok kontrol, peneliti menggunakan kelompok positif menggunakan *Tetrasiklin*. Tetrasiklin yang digunakan adalah dengan konsentrasi 2%.
- b) X termasuk kelompok eksperimen atau menggunakan perlakuan dimana terdapat lotion dengan ekstrak bawang dayak terdiri dari lima kategori:
 - X1 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 0%
 - X2 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 10%
 - X3 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 15%
 - X4 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 20%
 - X5 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 25 %
 - X6 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 30 %

$K(+)_1$	$X2_1$	$X3_4$	$X4_3$
$X1_2$	$X1_3$	$K(+)_4$	$X5_3$
$X2_3$	$X4_2$	$X5_1$	$X2_4$
$X3_4$	$X6_4$	$X2_2$	$X1_4$
$X4_1$	$X6_2$	$X3_1$	$X4_4$
$X5_2$	$X5_4$	$X6_1$	$K(+)_2$
$X6_3$	$K(+)_3$	$X3_3$	$X1_1$

Gambar 3.6 Denah Rancangan Acak Lengkap

Keterangan:

kelompok eksperimen yang menggunakan *lotion* konsentrasi ekstrak bawang dayak terdiri tujuh kategori:

- X1 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 0%
- X2 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 10%
- X3 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 15%
- X4 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 20%
- X5 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 25 %
- X6 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 30 %
- K(+): Kontrol positif tetrasiklin 2%
- 1 : Pengulangan ke 1
- 2 : Pengulangan ke 2
- 3 : Pengulangan ke 3
- 4 : Pengulangan ke 4

3.5.3 Pelaksanaan dan Alur Penelitian

Pelaksanaan penelitan dilakukan agar jalannya penelitian lancar dan tidak mengalami kegagalan. Alur penelitian yang runtut akan memudahkan peneliti dalam melakukan kegiatan. Langkah-langkah pelaksanaan penelitian terdiri dari beberapa tahapan antara lain:

1. Pembuatan Simplisia Bawang Dayak

Bawang dayak (*Eleutherine palifolia*) seberat 3 kilogram dipilah dan pilih yang umbinya baik. Bawag dayak yang sudah dilakukan pemilahan dikumpulkan kemudian dicuci di bawah air mengalir, ditiriskan lalu dirajang. Sampel dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka yang terlindung dari sinar matahari langsung. Kemudian dibuat serbuk menggunakan blender lalu di ayak dengan mesh 60 setelah itu disimpan dalam botol kaca.

[illegible]

Keterangan:

Komposisi lotion bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) terdiri tujuh kategori:

- X1 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 0%
- X2 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 10%
- X3 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 15%
- X4 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 20%
- X5 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 25 %
- X6 : konsentrasi ekstrak bawang dayak 30 %
- K(+) : Kontrol positif tetrasiklin 2%

4. Pembuatan Medium Biakan Bakteri *MHA*

Pembuatan *MHA* dilakukan agar bakteri dapat diperbanyak dan tumbuh banyak untuk dilakukan penelitian. Pembuatan dilakukan pada lab mikrobiologi UMM yang telah terstandarisasi kesterilan guna penelitian. Langkah-langkah pembuatan media biakan bakteri sebagaimana penelitian Waluyo, 2010 yakni:

- 1) Mengeluarkan medium *MHA* yang sudah steril dari otoklaf
- 2) Memanaskan kembali media *MHA* agar mencair
- 3) Menuangkan medium *MHA* cair sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri ke dalam engkast dan tunggu hingga padat

5. Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibakterium acnes*

Pembuatan suspensi dengan cara mengambil 1-2 ose dari biakan murni bakteri *P.acnes*. Biakan murni yang diambil tersebut diencerkan dengan NaCl 0.85% sampai didapat kekeruhan sesuai dengan standart Mc. Farland 0.5 ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml). Standar Mc. Farland 0.5 dibuat dari 0.05 ml BaCl 1% dan 9.95 ml H₂SO₄ 1% (Padhi & Panda, 2015).

6. Uji Daya Hambat Dengan Metode Difusi Kertas Cakram

Langkah-langkah pembuatan media biakan bakteri sebagaimana penelitian Waluyo (2010), yakni:

1. Menyiapkan medium *MHA*
2. Mencelupkan kapas lidi atau *cotton* but steril ke dalam suspensi bakteri *P.acnes*
3. Memeras dengan cara menekan kapas lidi pada dinding tabung reaksi
4. Menggores kapas lidi di permukaan media *MHA* dengan teknik goresan sinambung. Goresan sinambung dilakukan dengan cara menggoreskan jarum ose secara kontinyu sampai setengah permukaan medium *MHA* dengan tanpa memijarkan jarum ose, cawan petri diputar 180°C dilanjutkan goresan sampai habis
5. Memasukkan cakram yang telah direndam dengan formula *lotion* bawang dayak ke dalam cawan petri. Kertas cakram tersebut diletakkan dipermukaan media yang terdapat biakan *P.acnes*, tekan dengan pinset agar kertas cakram benar-benar menempel pada media.
6. Memberi label pada bagian luar cawan petri sesuai dengan perlakuan
7. Meletakkan kedalam inkubator dengan susunan sesuai RAL
8. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

7. Pengaplikasian Zona Hambat pada Bakteri *Propionibacterium acnes*

Cakram disk yang sudah direndam selama 15 menit pada formulasi ekstrak bawang dayak dalam lotion X1, X2, X3, X4, X5, X6, serta disc Terasiklin (K(+)) diletakkan di media agar darah yang telah ditanami *Propionibacterium acnes*. Inkubasi cawan petri yang telah dimasukkan cakram disk tersebut selama 24 jam pada suhu 37°C . Meletakkan cawan petri pada tempat yang terang dan mengukur diameter zona bening pada sekeliling cakram disk dan menentukan potensi

antibakteri. Penghitungan diameter koloni dilakukan dengan cara membuat garis vertikal dan horizontal berpotongan tepat pada titik tengah koloni bakteri masing-masing konsentrasi dengan rumus menurut (Armanda, Ichrom, & Budiarty, 2017) sebagai berikut:

$$D = \frac{D1-D2}{2}$$

Keterangan:

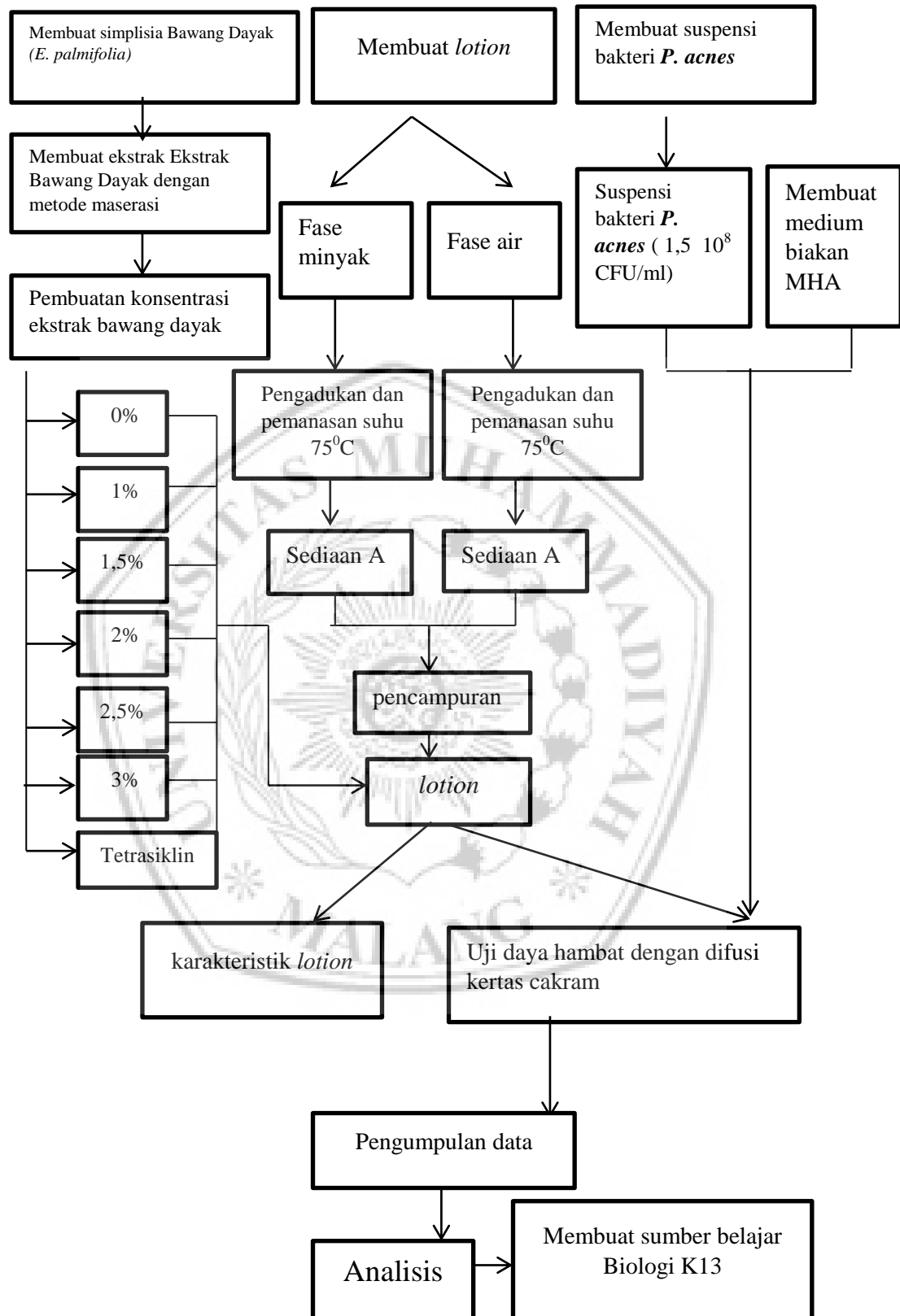
D1 : diameter vertical bakteri yang diamati

D2 : diameter horizontal bakteri yang diamati

8. Uji Kualitas *Lotion* Bawang Dayak

Uji aktivitas *lotion* bawang dayak terhadap zona hambat bakteri pertumbuhan *Propionibacterium acnes* merupakan tahapan penelitian yang secara urut dilaksanakan. Aktivitas yang dilakukan seperti mengambil sebanyak 1 mL suspensi *Propionibacterium acnes* yang setara dengan Mac Farland 0,5 diinokulasikan ke dalam media MHA steril, kemudian dibiarkan memadat. Sebanyak dua puluh delapan patri disk disiapkan, kemudian mengisi empat patridisk diisi *lotion* bawang dayak dengan konsentrasi 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% dan patridisk tersisa diisi kontrol dan kontrol positif (tetrasiklin 2%). Inkubasi selama 24 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C dan diamati zona hambatnya (Tiran & Nastiti, 2014).

Uji kualitas *lotion* dilakukan untuk melihat tidak terjadi kerusakan pada kandungan metabolit sekunder yang ada dalam *lotion*. Pada uji kualitas ini alat dan bahan harus terjamin kesetrilannya begitu juga dengan ruangan serta kebersihan peneliti. Peneliti menggunakan alkohol 70% agar tidak terjadinya kontaminasi saat melakukan penelitian .



Gambar 3.5.3 Alur Penelitian

3.6 Metode Pengumpulan Data

3.6.1 Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data adalah prosedur yang sistematis dan standar untuk memperoleh data. Dalam hal ini peneliti menggunakan beberapa metode atau teknik pengumpulan data yaitu observasi langsung. Menurut Rofieq (2001) menyatakan bahwa observasi (*observations*) merupakan teknik pengumpulan data secara langsung dengan prosedur berencana yang melibatkan kegiatan melihat dan mencatat aktivitas dan kegiatan tertentu.

3.6.2 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian adalah alat atau fasilitas yang digunakan oleh peneliti dalam mengumpulkan data agar pekerjaannya lebih mudah dan hasilnya lebih baik, dalam arti lebih cermat, lengkap, dan sistematis sehingga lebih mudah diolah. Peneliti melakukan percobaan dan pengujian untuk mendapatkan data terhadap objek perlakuan yang dilaksanakan di laboratorium. Observasi dalam penelitian ini adalah mengambil data tentang dari diameter zona hambat bakteri *Propionibakterium acnes* dari pembuatan *lotion* ekstrak bawang dayak. Penelitian ini menggunakan berbagai jumlah ekstrak yang diberikan dalam campuran *lotion* dengan melihat diameter zona hambat yang terbentuk. Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah lembar observasi pengamatan. Lembar observasi ini digunakan untuk mencatat hasil uji dari diameter zona hambat bakteri yang ada pada setiap cawan petri, mengukur parameter penelitian *lotion* yang terbentuk zona bening pada sekeliling cawan petri yang telah ditumbuhi oleh bakteri pada disk, uji diameter zona hambat. Tabel 3.11 Instrumen Penelitian Diameter Zona Hambat sebagai berikut:

Tabel 3.11 Instrumen Penelitian Diameter Zona Hambat

Konsentrasi ekstrak	Diameter Zona Hambat Lotion Bawang Dayak (<i>Eleutherine palmifolia</i>)					
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Total	Rata-rata
0%						
10%						
15%						
20%						
25%						
30%						

3.7 Teknik Analisis Data

Analisa deskriptif kuantitatif berupa data diameter zona hambat bakteri *Propionibakterium acnes*. Apabila data yang diperlukan dalam penelitian cukup dan lengkap, maka langkah yang harus dilakukan yaitu mengetahui data tersebut berdistribusi normal dan variasi datanya homogen. Oleh karena itu, perlu adanya uji normalitas dan homogenitas dengan menggunakan salah satu aplikasi yaitu SPSS 22.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*). Data dari hasil penelitian pengaruh aktivitas lotion bawang dayak (*E. palmifolia*) terhadap zona hambat bakteri *P.acnes* dianalisis dengan menggunakan aplikasi software statistika SPSS 22.0 agar mendapat hasil yang lebih signifikan dalam penelitian.

Tujuan aplikasi statistika ini untuk melihat ada pengaruh signifikan terhadap perbedaan presentase ekstrak dalam lotion bawang dayak dilihat dari diameter zona hambat bakteri *Propionium acnes*. Apabila data tersebut berdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan uji homogenitas. Setelah data uji asumsi terpenuhi, maka dapat dianalisis dengan (*One Way Anova*). Apabila ada pengaruh yang sangat nyata diantara perlakuan, maka uji dilanjutkan dengan menggunakan uji

Duncan's. Apabila uji asumsi tidak terpenuhi maka uji yang dilakukan adalah *Kruskal wallis* serta uji lanjut *Bonferoni* ataupun *Games-Howell*.

